

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift  
⑪ DE 3917645 A1

⑳ Aktenzeichen: P 39 17 645.2  
㉑ Anmeldetag: 31. 5. 89  
㉒ Offenlegungstag: 28. 12. 89

⑤① Int. Cl. 4:  
C12P 1/00  
C12N 9/00  
C12N 9/50  
// C11D 3/386

DE 3917645 A1

③① Innere Priorität: ③② ③③ ③①

23.06.88 DE 38 21 151.3

⑦① Anmelder:

Henkel KGaA, 4000 Düsseldorf, DE

⑦② Erfinder:

Wüst, Willi, Dr., 4030 Ratingen, DE; Kühne, Norbert,  
5657 Haan, DE

⑤④ Verfahren zum Abtrennen von Farbstoffen und/oder Geruchsstoffen aus reduktionsstabile Wertprodukte enthaltenden Fermenterbrühen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Abtrennen von Farb- und/oder Geruchsstoffen aus reduktionsstabile Wertprodukte enthaltenden Fermenterbrühen. Um den Gehalt dieser Stoffe so stark zu senken, daß das gereinigte Produkt ohne weitere chemische Behandlung Wasch- und Reinigungsmitteln zugegeben werden kann, werden erfindungsgemäß die höhermolekularen Bestandteile ausgefällt und diese dann mit einem Reduktionsmittel gebleicht.

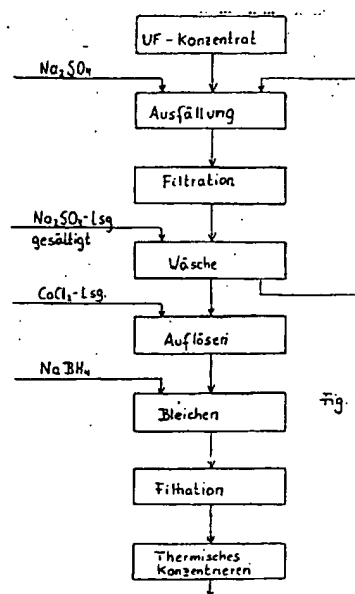


Fig. 1

DE 3917645 A1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Abtrennen von Farbstoffen und/oder Geruchsstoffen aus reduktionsstabile Wertprodukte enthaltenden Fermenterbrühen. Diese Lösungen sind braun bis schwarz gefärbt und riechen außerdem äußerst unangenehm. Um die Farb- und Geruchskomponenten von den Wertprodukten, z.B. Enzymen abzutrennen, wurde seit Beginn der 80er Jahre Fällungen, z.B. mit 1,2 Propylenglykol, aber auch mit Carboxylaten oder anderen Stoffen eingesetzt, um saubere Präparate zu gewinnen. Zur Stabilisierung von Enzymen in Flüssigwaschmitteln werden dann Calciumionen, niedere Carbonsäuren, Borate und anderes zugegeben. Diese aus der Literatur bekannten Verfahren führen jedoch zu keinen befriedigenden Ergebnissen. Ein Teil der Farb- und Geruchskomponenten kann zwar abgetrennt werden, aber es bleiben noch genügend viele dieser Komponenten in der Lösung, so daß keineswegs von einer sauberen Enzympräparation gesprochen werden kann. Auch die aus der Literatur bekannten Verfahren zur Anreicherung von Protease mit Propylenglykol mittels Extraktion ergeben ebenfalls negative Ergebnisse, auch wenn eine Reihe von Parametern variiert werden. Auch Versuche, die Farbkomponente mittels Elektrodialyse abzutrennen, verlaufen erfolglos. Zwar können bei den genannten Verfahren die Anteile der Farb- und Geruchskomponenten herabgesetzt werden, aber die Anteile bleiben noch zu groß, um die Enzympräparation bei Waschmitteln einsetzen zu können.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Abtrennen von Farbstoffen und/oder Geruchsstoffen aus reduktionsstabile Wertprodukte enthaltenden Fermenterbrühen zu schaffen, mit dem der Gehalt dieser Stoffe so stark gesenkt werden kann, daß das gereinigte Produkt ohne weitere chemische Behandlung Wasch- und Reinigungsmitteln zugegeben werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß aus den Fermenterbrühen die höhermolekularen Bestandteile ausgefällt werden und diese dann mit einem Reduktionsmittel gebleicht werden.

Die Vergeblichkeit der bekannten Versuche zur Lösung dieses Problems hatte ihre Ursache darin, daß die Farb- und Geruchskomponenten nicht aus einer, sondern aus mehreren Substanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten bestehen. Daher kann der Einsatz eines einzigen Reinigungsverfahrens nicht zum Ziel führen, ein sauberes Präparat zu gewinnen.

Erfindungsgemäß werden dagegen beim Ausfällen die Komponenten mit relativ niedrigem Molekulargewicht abgetrennt, aber die höhermolekularen Komponenten verbleiben bei den Wertprodukten. Die wirksamen Zentren dieser Farb- und Geruchskomponenten werden durch das darauffolgende Bleichen zerstört. Mit dem Rückgang der Farbkomponenten geht auch der Geruch fast völlig zurück. Die Erfindung liegt aber nicht in dem Bleichen alleine, denn ein Bleichen ohne ein vorheriges Ausfällen führt nicht zu dem gewünschten Ergebnis. So kann mit dem Ausfällen alleine nur eine 30- bis 40%ige Farbreduzierung erreicht werden. Das gleiche gilt für ein Bleichen ohne das Ausfällen. Bei einer Kombination dieser Maßnahmen läßt sich jedoch eine helle, blaßrosa Farbe der Präparation mit einem äußerst schwachen Geruch erreichen.

Das Verfahren ist besonders gut für Enzymlösungen und insbesondere für Proteaselösungen geeignet.

Ein besonders gutes Ergebnis wird mit dem erfin-

dungsgemäßen Verfahren erzielt, wenn das ausgefällte Produkt vor dem Bleichen mit einer gesättigten Lösung des Ausfällungsmittels gewaschen wird. Die Waschflüssigkeit sollte aus wirtschaftlichen Gründen zum Ausfällen der hochmolekularen Komponenten der nächsten Charge von Proteaselösung zurückgeführt werden. Eine besonders gute Abtrennung der Farb- und Geruchskomponenten ergibt sich, wenn als Ausfällungsmittel Natriumsulfat verwendet wird.

Vorteilhaft ist ebenfalls, wenn vor dem Bleichen das ausgefällte Produkt mit einer Calciumchloridlösung aufgelöst wird.

Bei den Reduktionsmitteln ist es besonders wichtig, daß diese inaktiv gegenüber den Enzymen, voll wirksam schon bei Temperaturen unter 40°C, in Wasser ausreichend stabil, gut dosierbar und daß der Überschuß der Reduktionsmittel leicht entfernbar ist sowie die nach der Reduktion aus dem Reduktionsmittel entstehenden Stoffe waschmittelverträglich und nicht umweltbelastend sind. Außerdem sollten die Reduktionsmittel ein hohes Reduktionspotential, niedrige spezifische Verbrauchsmengen und niedrige Verbrauchskosten haben. Diese Forderungen werden von Boranaten, insbesondere Natriumborhydrid, reduzierenden Kationen, insbesondere zweiwertigem Zinn, Endiolen, insbesondere Ascorbinsäure, reduzierenden Sacchariden, insbesondere Glucose, dreiwertigen Phosphorverbindungen, insbesondere  $\text{HPO}(\text{OH})_2$ , erfüllt.

Vorzugsweise wird bei einer Verwendung von Natriumborhydrid als Bleichmittel nach dem Bleichen die Lösung neutralisiert oder gepuffert, da sich aus Natriumborhydrid Natriumhydroxid bildet, aber die Enzympräparation einen sehr engen pH-Wert für ihre Stabilität benötigt. Natriumborhydrid ist als Bleichmittel auch deshalb vorteilhaft, weil nach dem Bleichen Borsäure entsteht, die ein Enzymstabilisator ist.

Um eine besonders saubere Enzympräparation zu gewinnen, wird vorzugsweise nach dem Bleichen filtriert.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird im folgenden anhand der Zeichnungen näher beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1 ein Flußdiagramm der erfindungsgemäßen Verfahrensschritte,

Fig. 2 den Farbgehalt von Enzymlösungen vor und nach einer Fällung mit Natriumsulfat und vor und nach dem Bleichen mit einer 1- bzw. 2%igen Natriumborhydridzugabe,

Fig. 3 einen Vergleich der Entfärbungen durch Fällung mit Natriumsulfat und mit Ammoniumsulfat,

Fig. 4 das Ergebnis eines Bleichens mit Natriumborhydrid bei unterschiedlichen Zugaben des Bleichmittels.

Nach Fig. 1 wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren von einem durch Ultrafiltration gewonnenen Konzentrat der Enzympräparation ausgegangen. Eine Zugabe von Natriumsulfat fällt die hochmolekularen Komponenten, nämlich die Enzyme und einige der Farb- und Geruchsstoffe aus. Dabei wird festes Natriumsulfat verwendet. Das gefällte Produkt wird filtriert und zentrifugiert. Der so erhaltene Kuchen enthält die niedermolekularen Anteile der Farb- und Geruchskomponenten nicht mehr. Dieser Kuchen wird zum weiteren Reinigen mit einer gesättigten Natriumsulfatlösung gewaschen. Die Waschflüssigkeit wird aus Wirtschaftlichkeitsgründen zum Füllen einer weiteren Charge benutzt. Für das Bleichen wird der Kuchen wieder aufgelöst. Dazu wird eine 1%ige Calciumchloridlösung verwendet. Der gelöste Kuchen wird mit Natriumborhydrid gebleicht. Zum Dosieren des Bleichmittels wird etwa 1/2 Stunde, zur

Reaktion etwa die gleiche Zeitspanne benötigt. Nach dem Bleichen wird blankfiltriert und das erhaltene Filtrat thermisch konzentriert.

Die Erfindung ist jedoch nicht auf die in diesem Beispiel genannten Fällungs- und Bleichmittel beschränkt. 5

Als Fällungsmittel kann z. B. auch Ammoniumsulfat verwendet werden, wie die Fig. 3 zeigt. Die linken Säulen der beiden Säulenpaare kennzeichnen darin die Enzymausbeute nach einer Fällung, die rechten Säule jedes Paares die Farbreduzierung nach der Fällung. Das linke 10 Säulenpaar bezieht sich auf eine Fällung mit Natriumsulfat, das rechte Säulenpaar auf eine Fällung mit Ammoniumsulfat. Wie zu erkennen ist, wird durch eine Fällung zwar die Farbe reduziert, womit auch eine Geruchsreduzierung einhergeht, aber diese Reduktion beträgt nur etwa 30 bis 40% bezogen auf die Komponenten vor der Fällung. 15

Erst die Kombination von Fällung und Bleichung führt zu einer erheblichen Farbreduzierung, wie aus Fig. 2 ersichtlich ist. Die linken Säulen jeden Säulenpaares zeigen wieder die Enzymausbeute, bezogen auf den Anfangsgehalt, und die rechten Säulen den Farb- und Geruchsstoffgehalt, ebenfalls bezogen auf den Anfangsgehalt vor dem Fällern und Bleichen. Hier ist im linken Säulenpaar das Ergebnis einer Fällung mit Natriumsulfat dargestellt, in der Mitte das Ergebnis eines Bleichens mit 1 Gew.-% Natriumborhydrid bezogen auf die Lösung nach einer vorherigen Fällung mit Natriumsulfat. Am rechten Rand ist das gleiche dargestellt, aber mit 2% Natriumborhydrid. Wie zu erkennen ist, bringt 20 erst die kombinierte Wirkung von Fällern und Bleichen den gewünschten Erfolg. 25

In Fig. 4 ist die Enzymausbeute, dargestellt durch Kreise, und der Farbestoffgehalt, dargestellt wurde Kreuze, in Abhängigkeit von der Zugabe des Bleichmittels 35 Natriumborhydrid gezeigt. Es ist zu erkennen, daß die Enzymausbeute nur leicht bei steigender Natriumborhydridzugabe abnimmt, aber der Farbestoffgehalt, der nach der Fällung auf einen Wert von etwa 60% gesunken ist, drastisch zurückgeht auf etwa 10%. Bei Zugabe von über 2% Natriumborhydrid tritt kaum eine weitere Verminderung des Farbestoffgehaltes ein. Die optimale Konzentration von Natriumborhydrid liegt also bei 2 40 Gew.-%, bezogen auf die Enzymlösung. 45

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Abtrennen von Farbstoffen und/oder Geruchsstoffen aus reduktionsstabile Wertprodukte enthaltenden Fermenterbrühen, **dadurch gekennzeichnet**, daß aus den Fermenterbrühen die höhermolekularen Bestandteile ausgefällt werden und diese dann mit einem Reduktionsmittel gebleicht werden. 50
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Wertprodukte Enzyme sind. 55
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermenterbrühe eine Proteaselösung ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, 60 dadurch gekennzeichnet, daß das ausgefallte Produkt vor dem Bleichen mit einer gesättigten Lösung des Ausfällungsmittels gewaschen wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung des Ausfällungsmittels 65 nach dem Waschen zum Ausfällen zurückgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,

dadurch gekennzeichnet, daß als Ausfällungsmittel Natriumsulfat verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Bleichen das ausgefallte Produkt mit einer Calciumchloridlösung aufgelöst wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Bleichmittel Boranate, insbesondere Natriumborhydrid, reduzierende Kationen, insbesondere zweiwertiges Zinn, Endiole, insbesondere Ascorbinsäure, reduzierende Saccharide, insbesondere Glucose oder eine dreiwertige Phosphorverbindung, insbesondere  $\text{HPO}(\text{OH})_2$  verwendet wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Bleichen die Lösung neutralisiert oder gepuffert wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß zum Bleichen bis zu 3 Gew.-% Natriumborhydrid, bezogen auf die Enzymlösung, insbesondere 2 Gew.-% zugegeben wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Bleichen filtriert wird.

3917645

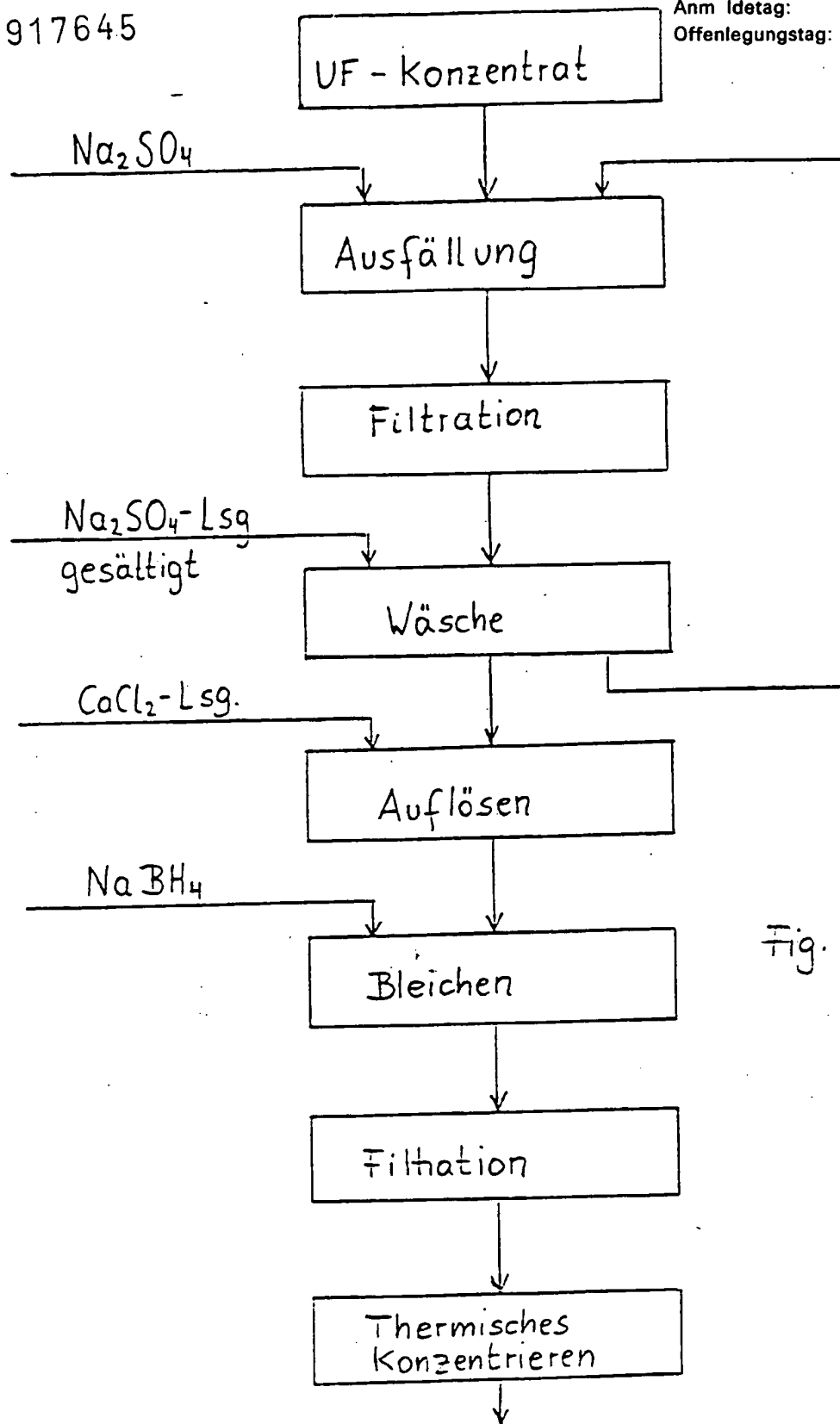
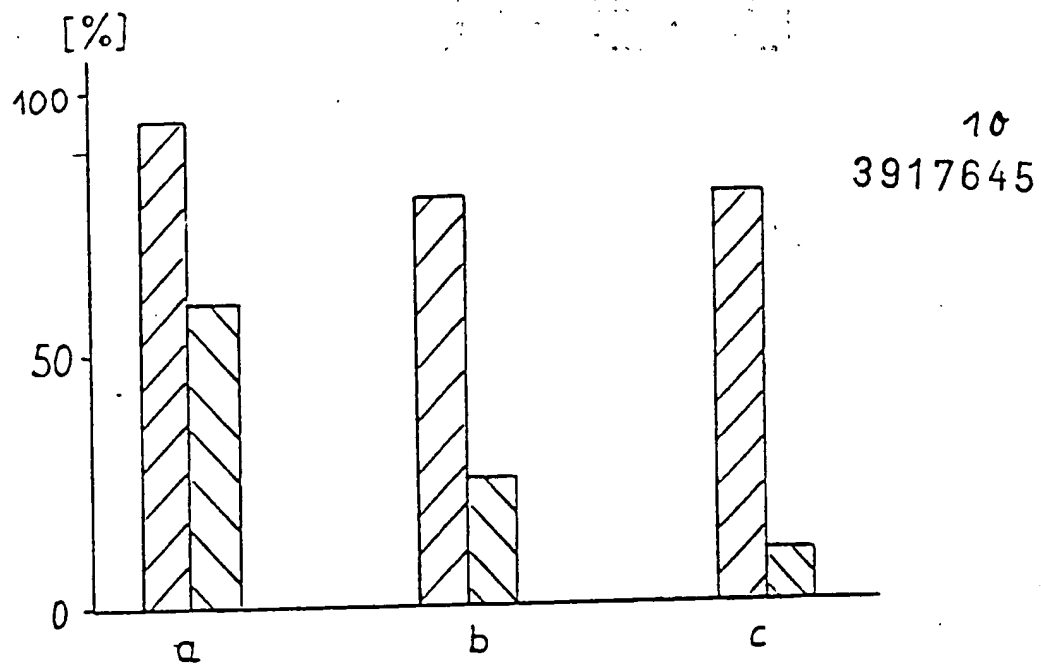
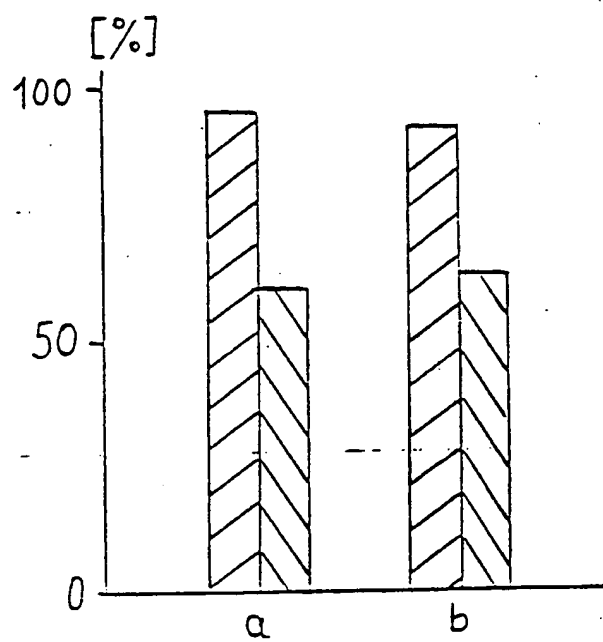


Fig. 1



Figur 2



Figur 3

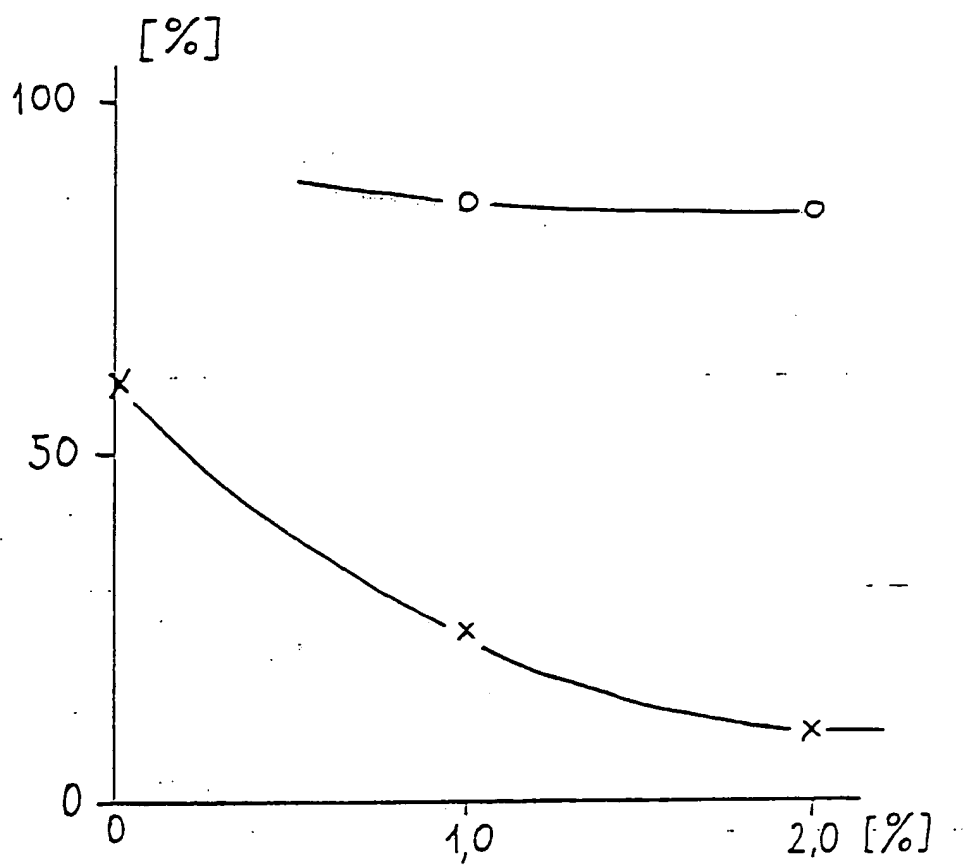


Fig. 4